

[First Hit](#) [Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)

End of Result Set

☐ **Generate Collection** **Print**

L2: Entry 1 of 1

File: DWPI

Jun 1, 1992

DERWENT-ACC-NO: 1992-231694

DERWENT-WEEK: 199228

COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Analysing mono- and oligo-saccharide(s) - using liq. chromatography column filled with filler contg. amino cpd.

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

ASAHI CHEM IND CO LTD

ASAHI

PRIORITY-DATA: 1990JP-0281929 (October 22, 1990)**Search Selected****Search ALL****Clear**

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

☐ JP 04158260 A

June 1, 1992

006

G01N030/48

APPLICATION-DATA:

PUB-NO

APPL-DATE

APPL-NO

DESCRIPTOR

JP 04158260A

October 22, 1990

1990JP-0281929

INT-CL (IPC): B01J 20/26; G01N 30/48; G01N 30/88

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 04158260A

BASIC-ABSTRACT:

In analysing sugars by a liq. chromatography column filled with a filler with primary amino, secondary amino or/and tertiary amino cpd, a filled column having more than 0.6 free type amt. ratio of amino group. the free type amt. ratio = 1, (amt. of free type amino group) divided (total amt. of amino group).

USE/ADVANTAGE - By using column of high free type amt. ratio of amino group, high sepn. efficiency is obtained. By using alkali soln. as eluent, adverse influence of acidic substances in sample liq. or eluent can be eliminated and high reproducibility of the analysis of sugars be obtd.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.1/1

TITLE-TERMS: ANALYSE MONO OLIGO SACCHARIDE LIQUID CHROMATOGRAPHY COLUMN FILLED FILL CONTAIN AMINO COMPOUND

ADDL-INDEXING-TERMS:

SUGAR

DERWENT-CLASS: A14 A89 D17 E13 J04 S03

CPI-CODES: A12-L04; A12-M; D06-G; E10-A07; E11-Q03; J04-B01C;

EPI-CODES: S03-E09C5;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M3 \*01\*

Fragmentation Code

H4 H405 H484 H8 J4 J471 J5 J581 K0 L8  
L814 L818 L821 L831 M280 M311 M314 M315 M321 M332  
M342 M344 M349 M381 M391 M392 M416 M620 M750 M903  
M904 M910 Q241 R023

Specific Compounds

00038A 00134A

Chemical Indexing M3 \*02\*

Fragmentation Code

F012 F013 F014 F015 F016 F017 F019 F113 F123 H4  
H405 H423 H424 H483 H484 H5 H521 H8 J4 J471  
K0 L8 L814 L818 L819 L822 L831 M1 M126 M141  
M280 M311 M315 M321 M323 M332 M342 M344 M349 M373  
M381 M391 M393 M413 M510 M521 M522 M530 M540 M750  
M903 M904 M910 Q241 R023

Specific Compounds

00135A 00292A

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0038U ; 0134U ; 0135U ; 0292U

POLYMER-MULTIPUNCH-CODES-AND-KEY-SERIALS:

Key Serials: 0229 1989 2411 2585

Multipunch Codes: 014 03- 259 425 575 583 589

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1992-104480

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1992-176352

[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-158260

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)6月1日

G 01 N 30/48  
B 01 J 20/26  
G 01 N 30/88

P 7621-2 J  
G 2104-4 G  
N 7621-2 J

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 糖類の分析方法

⑯ 特 願 平2-281929

⑰ 出 願 平2(1990)10月22日

⑱ 発 明 者 平 田 憲 子 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内

⑲ 発 明 者 笠 井 雅 夫 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内

⑳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明 細 書

1. 発明の名称

糖類の分析方法

2. 特許請求の範囲

1. 一級アミノ基、二級アミノ基またはおよび三級アミノ基を有する充填剤の充填された液体クロマトグラフィーカラムで糖類を分析するにあたり、アミノ基の遊離型量比が0.6以上にある充填カラムを用いて、糖類を分析する方法。

但し、 $\text{遊離型アミノ基量}$

$\text{遊離型量比} = \frac{\text{アミノ基の総量}}{\text{アミノ基の総量}}$

アミノ基の総量

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、アルカリ溶液に耐久性のあるアミノ基を有する弱塩基性アニオン交換体の充填された液体クロマトグラフィーカラムを用いた単糖、オリゴ糖の分離分析方法に関する。

〔従来の技術〕

糖類は単糖類として存在するばかりでなく、いくつかの単糖が結合してできるオリゴ糖から数種類の単糖類が数多く結合して高分子を形成するデンプンやセルロースのような多糖類まで広く自然界に存在する。

液体クロマトグラフィーは、糖の分離分析に適しており、広く汎用されている。液体クロマトグラフィーによる単糖やオリゴ糖の分離分析方法には、分子フルイ、逆相分配、イオン交換、配位子交換その他のカラムを用いる方法がある。

糖を分子フルイ機構で分離する方法は、充填剤の微細孔径分布を利用して各種の糖類を分子サイズの差によって分離する方法であるため、多糖類やオリゴ糖の分離分析に広く用いられているものの、分離能力が劣り、分子量の等しい単糖やオリゴ糖の相互分離にはまったく適さない。

オリゴ糖の分離分析方法に、オクタデシルのようなアルキル基を化学結合させた逆相分配クロマトグラフィー用カラムを用いる方法がある。この

方法も分子量の等しい単糖やオリゴ糖の相互分離に難点があり、適用できる試料が著しく限定される。

分子量に差のない単糖やオリゴ糖の相互分離に適合する分離分析方法として、スルホン酸基を有するポリスチレンゲルの対イオンに金属イオンをイオン結合させたゲルを充填剤にして、糖と金属イオンとの配位子交換を利用する方法がある。しかしながら、この方法は、イオン結合で充填剤に存在させている金属イオンが脱離し易く、継続使用における経時変化の問題がある。

強塩基性アニオン交換樹脂の充填されたカラムを用いて、pH1以上の強アルカリ液を溶離液にして、糖の水酸基を陰イオンに解離させアニオン交換作用で分離する方法もある。この方法は単糖やオリゴ糖の分離性能がすぐれているものの、糖の分解、装置のアルカリ耐性、溶離液中の塩類の析出問題等、多くの欠点がある。

単糖やオリゴ糖の分離方法として広く知られている他の方法として、シリカゲルにアミノプロピ

ル基あるいはポリアミンを化学結合させた充填剤を用い、溶離液として水とアセトニトリルの混合液を用いる方法があげられる。この方法は、一定組成の溶離液を用いるために操作が簡便で、かつ分子量に差のない単糖、オリゴ糖の相互分離にも高い分離能を有している。しかしながら、アミノ基を有するシリカゲル充填剤は、水溶液やpH耐性に大きな欠点があり、分離性能、再現性、カラムの耐久性等に解決すべき課題が残されていた。

#### [発明が解決しようとする課題]

本発明は、従来の分離分析方法の中にあって、操作が簡便で高い分離性能も期待できるアミノ基を有する弱アニオン交換体を充填剤とする液体クロマトグラフィーカラム（以下、アミノカラムと略称）を用い、単糖、オリゴ糖を分離分析する改良された糖分析法を提供する。

本発明者らは、従来技術の再現性の欠如や早期カラム劣化の問題を解消するとともに、アミノカラムを用いる糖分析方法では提示されなかった選

元糖のアノマーに起因するピークの広がりの問題を克服する分離分析方法を確立し本発明をなすに至った。

#### [課題を解決するための手段]

本発明に用いる充填剤は、一般アミノ基、二級アミノ基またはおよび三級アミノ基、即ち、弱塩基性アニオン交換基を有する充填剤からなる。本発明に好適な充填剤は、例えばビニルアルコール・コポリマーにアミノ基量が0.5~2.0meq/g導入されたゲルが用いられる。更に詳しくは以下のものが好ましい。ビニルアルコール単位と架橋性単量体単位を有し、コポリマー重量当たりのビニルアルコール単位に由来する水酸基量が0.5~4.0meq/g、弱塩基性アニオン交換基量が0.5~2.0meq/g、保持し得る水の量が0.5~4.0g/gの架橋共重合体であって、架橋性単量体単位の割合(X)が0.45≤X≤0.8の範囲にある事の特徴とする、陰イオン交換体。

$$\text{(但し)} \quad X = \frac{n \cdot b}{a + n \cdot b}$$

ここで、aは架橋共重合体中の架橋性単量体単位を除く単量体単位モル分率、bは架橋性単量体単位モル分率、nは架橋性単量体1分子が有するエチレン性二重結合の数を示す。）

即ちこれら充填剤は、各種緩衝液およびpH1~13のアルカリに対して耐性を示すので好ましい。その詳細は製造方法も含めて、特開平2-227144に詳述されている。

本発明に用いる充填剤の粒子径は、特に限定されるものではないが、平均粒径として3~50μm、好ましくは4~20μmが望ましい。3μm以下では高速処理が難しくなり、50μmを超えると分離性能が著しく低下し、実用的でない。

本発明に用いるカラムの製作方法は、一般に知られた方法で何等支障がなく、湿式スラリー法の定圧充填法で良い。ゲルを充填する際の圧力は用いるゲルの粒子径によって異なるが、30~200kg

／ $\text{cm}^2$ で満足できるカラムが得られる。

次に本発明で特に重要な要件となる充填剤におけるアミノ基の形態と糖類の分離方法について詳細説明する。本発明でいう糖類とは、単糖、オリゴ糖である。従来方法においては、還元糖における例えばグルコースと呼ばれる単糖において、 $\alpha$ 型と $\beta$ 型のアノマーが存在し、このアノマーが液体クロマトグラフィー分析時に異なった溶出特性を示す。分析条件によっては $\alpha$ と $\beta$ のアノマーの溶出位置が異なってくるため、極端な条件では2つのピークに分離し、分離しない条件でもピークの幅が広がりブロードになる。多くの単糖やオリゴ糖の分離分析では、このアノマーの分離は共存する他の糖との分離に支障をきたすため、分離しない条件におくことが肝要となる。前記の配位子交換による分析法では80℃の高温下で分析することでこの問題に対処している。一方、従来のアミノカラムを用いる分析方法では、充填剤に塩基性を持つアミノ基が存在することもあり、これまで同様の問題があまり取り上げられなかった。し

して求める。分析時の遊離型アミノ基量は、上記の無水メタノールによる液置換以降の同じ操作によって求める。

本発明方法による糖類の分離方法は、予めpH12～13のアルカリ水溶液、例えば、NaOH水溶液を1時間～1夜通液してカラム内のアミノ基を遊離型化した後、50～90%アセトニトリル水溶液を溶離液にして試料液を注入して行う。この方法では、分離分析を繰り返している間に試料液あるいは溶離液中に共存する微量の酸性物質が吸着し、徐々に遊離型量が低下してくるため、適当な間隔で上記の遊離型化操作を行う必要がある。

本発明方法による別の糖類の分離分析方法として、pH 9～11のアルカリ水溶液とアセトニトリルの50～90%混合液を溶離液にして行う方法がある。ここに用いるアルカリ試薬はNaOH、KOH等でも良いが、水酸化テトラプロピルアンモニウム、水酸化テトラブチルアンモニウム等の四級の水酸化アルキルアミンを酢酸等の酸でpH調整した緩衝液が好適である。他の緩衝液として酢酸ナトリ

かしながら、本発明者らの検討の結果、アミノカラムにおける糖分析においても糖アノマーの問題は、分離性能に大きく関与していることが判明した。

本発明方法においては、アミノ基の遊離型量比を高くすることが高分離性能の重要要件であり、またアミノ基の遊離型量比を一定にすることが、再現性の確保に不可欠である。即ち糖類の分離分析に際して充填剤のアミノ基の遊離型量比を0.6以上、好ましくは0.8以上、更に好ましくは0.9以上にすることが必要である。本発明でいう遊離型量比は次式で定義する。

$$\text{遊離型量比} = \frac{\text{分析時の遊離型アミノ基量}}{\text{カラム内の総アミノ基量}}$$

カラム内の総アミノ基量は、カラムに0.1N-HNO<sub>3</sub>水溶液30mlを1時間かけて通液し、無水メタノール15mlを30分間通液して液置換した後、0.1N-NaOH水溶液20mlを40分間通液し、その溶離液を採取し、同溶離液中のNaNO<sub>3</sub>を定量

ウム、酢酸アンモニウム等も適合する。緩衝液を用いる場合、その濃度はアセトニトリルを混合する前の水溶液の状態で10～100mMが好ましい。10mM以下では緩衝能が不十分になり、100mM以上は濃度を上げる利点が見当たらない。アルカリ水溶液のpHが9以下では、アミノ基の遊離型量比低下に伴うピークのブロード化が著しくなり、pH11以上では二糖類の溶出特性が著しく変化するため良好な分離が得られ難くなる。本発明方法で糖類を分析すると、常に一定組成のアルカリ液が溶離液として通液されているため、アミノ基の遊離型量比が一定比率に保たれ、従来の糖アノマー分離の問題を解消しピークの幅が極めてシャープになり高分離性能を発揮すると同時に、従来技術に無い高い再現性が確保される。

本発明方法によると従来技術のような高温分析は特に必要とせず室温で良いが、4～80℃の広い温度範囲で実施できることも勿論のことである。

本発明で一般的に適用する溶離液の流速は、空塔速度として0.1～10m/時間が好ましい。

送液ポンプ、試料注入器、検出器等の用いる液体クロマトグラフは従来の装置で何等支障がなく、検出方法も一般に広く知られている示差屈折計、ポストラベル法による紫外分光光度計等が適合できる。

#### 【実施例】

以下、実施例に従って、本発明を更に具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定するものでないことはいうまでもない。

#### 実施例1

酢酸ビニル 100g、トリアリルイソシアヌレート 145g ( $X=0.6$ )、酢酸nブチル 170g及び2,2アゾビスイソブチロニトリル7gよりなる均一混合液と、少量のポリビニルアルコールおよびリン酸ナトリウムを溶解した水1400mlとを還流冷却器、窒素導入管及び攪拌器を備えた5ℓの三口フラスコに入れ十分攪拌した。次いで、窒素気流下で攪拌しつつ、60℃で16時間重合を行って粒状コポリマーを得た。該コポリマーを濾過、

洗浄し、アセトン抽出した後乾燥した。ついで該コポリマーをカセイソーダ60gを溶解した水3ℓと共に、還流冷却器、窒素導入管及び攪拌器を供えた5ℓの三口フラスコに入れ、窒素気流下15℃で20時間攪拌して該コポリマーのケン化反応を行った後、濾過、水洗、更に乾燥した。ケン化によって得られたビニルアルコール・コポリマーの水酸基密度は2.5meq/gであった。

ついで該コポリマーをエピクロルヒドリン1380g、ジメチルスルホオキシド3ℓ、カセイソーダ0.15ℓと共に、還流冷却器、窒素導入管及び攪拌器を供えた5ℓの三口セパラブルフラスコに入れ窒素気流下30℃で20時間攪拌してエポキシ基を該コポリマーに導入した。

ついで該コポリマーをジメチルスルホオキシド、水で洗浄した。その後、該コポリマーを50%ペンタエチレンヘキサミン水3kgと共に、還流冷却器、窒素導入管及び攪拌器を供えた5ℓの三口セパラブルフラスコに入れ、窒素気流下30℃で20時間攪拌して一級、二級、三級のポリア

ミノ基を該コポリマーに導入した。該コポリマーを洗浄、乾燥した後、分級して粒子径5 $\mu$ mの陰イオン交換体を得た。該陰イオン交換体のアミノ基の量は1.3meq/g陰イオン交換体、水酸基の密度は2.5meq/g陰イオン交換体、保水量は0.7g/g陰イオン交換体であった。

4gの該陰イオン交換体を75%アセトニトリル水溶液に分散して、圧力250kg/cm<sup>2</sup>で内径4.6mm及び長さ1500mmのステンレスカラムに2時間、同分散液で通液して、充填カラムを作成した。

同方法で作成した4本のカラムに、それぞれpH2.84の酢酸水、pH8.50ならびに9.30の酢酸アンモニウム水、0.1Nカセイソーダ水を100ml通液した。

それぞれのカラムの遊離

型量比は表1に示す通りであった。

得られた遊離型量比の異なるカラムを用いて下記条件でフルクトース、グルコース、シュクロー

ス及びマルトースの混合物を分析し、糖類の溶出容量及び理論段数を測定し、表2ならびに図1に示した。表2ならびに図1に示す通り、遊離型量比が0.93以上のカラムで高い理論段数が得られた。更に遊離型量比の変化が、糖類の溶出容量に大きく影響することがわかった。

#### 分析条件

移動相	75%アセトニトリル水
流速	1.0ml/min
カラム恒温槽温度	30℃
検出器	屈折率計 SE-51 (昭和電工 製)

(以下余白)

表1	
	75%アセトニトリル水
A	0.32
B	0.82
C	0.93
D	0.99

表 2

	フルクトース		グルコース		ショクロース		マルトース	
	遊離量(ml)	理論段数	遊離量(ml)	理論段数	遊離量(ml)	理論段数	遊離量(ml)	理論段数
A	8.61	7400	11.19	2500	14.95	8300	18.74	3100
B	8.12	8300	10.53	5600	14.74	9200	18.12	7200
C	7.33	10200	9.44	7500	13.28	10800	16.05	8400
D	6.47	10100	8.43	8800	11.98	10100	13.69	9200

## 実施例 2

実施例 1 と同じ方法で 2 本の充填カラムを製作し、その 1 本については 10mM 水酸化テトラプロピルアンモニウムを酢酸で pH10 に調整した水溶液とアセトニトリルを 25/75 に混合した溶液を移動相としてフルクトース、グルコース、ショクロース及びマルトースの混合物を、200 検体連続分析を行った。当カラムの遊離型量比は 0.96 であった。本実施結果の溶出容量と理論段数を表 3 に示した。比較のために、75%アセトニトリル水で同様の連続分析を実施し、得られた結果を表 3 に示した。表 3 に示すように、本発明方法を用いれば、すぐれた再現性が長期にわたって得られた。

(以下余白)

表 3

		本発明方法		比較例	
		溶出容量 (ml)	理論段数	溶出容量 (ml)	理論段数
フルクトース	初 期	7.10	9300	6.82	9500
	200時間後	7.28	9200	7.60	9200
グルコース	初 期	9.03	7200	8.72	8100
	200時間後	9.25	7000	9.80	6400
ショクロース	初 期	12.56	9500	12.12	9900
	200時間後	12.85	9200	13.92	9500
マルトース	初 期	15.10	7700	14.54	8700
	200時間後	15.57	7800	16.97	6600

## [発明の効果]

以上のように、本発明方法は、アミノ基の遊離型量比を高い状態におくことによって、低温から常温分析で糖アノマーの分離問題を飛躍的に改善し、高い分離性能を可能にする。さらに溶離液にアルカリ性溶液を用いることによって、アミノ基の遊離型量比を一定にした結果、試料液や溶離液から持ち込まれる酸性物質による悪影響を排除し、

従来にない高い再現性を確保した。

## 4. 図面の簡単な説明

図 1 は実施例 1 において得られたアミノ基の遊離型量比と糖類の理論段数の関係を示したグラフである。A はショクロース、B はフルクトース、C はマルトース、D はグルコースである。

特許出願人

旭化成工業株式会社

